ttt

**双荧光素酶报告基因活性实验报告**

**检测结题报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **客户姓名** |  | **订单编号** |  |
| **项目启动日期** |  | **项目完成日期** |  |
| **报告撰写人** |  | **报告复核人** |  |
| **报告授权人** |  | **报告生效日期** |  |

尊敬的客户：

您好！

**成都奥创生物科技有限公司**是联合多家高校、科研院所发起，由一批基础生物学、生物医药、临床医学领域杰出的科学家带队组成。主营业务包括整体课题项目服务实验（分子、蛋白、细胞、动物、病理等），全方位生物、医学研究技术服务和科研设计咨询、生物医药企业CRO外包服务等。

**成都奥创生物**联合多位来自于了中山大学、四川农业大学大学、华中农业大学、四川大学、中科院等著名高校以及研究机构的专家学者担任企业顾问，其中专业覆盖肿瘤学、蛋白免疫学、分子生物学、细胞生物学、形态学等诸多领域，并与国内相关领域的专家以项目合作的方式联合开展转化医学研究，组成了一个优势交叉互补、高度专业的科研团队，负责研发课题的具体实施和推进，确保各项目的高效与质量。致力于实验科研平台互联，资源共享。借助此平台为广大科研院校，生物医药企业及个人提供分子、蛋白、细胞、病理等研究技术服务。

1. **整体项目平台**

能为广大客户提供从课题咨询，课题设计，项目实施到论文撰写，润色，发表等一站 式整体课题外包服务，强大的科研团队，全面的技术平台和完善的管理体系，让您的课题进展更加高效。

1. **核酸研究平台**

服务项目：核酸抽提，常规PCR，荧光定量PCR，微滴式数字PCR，载体构建，甲基化检测等。

1. **蛋白与免疫平台**

服务项目：Western blot，无标记分子互作检测，ELISA，多因子蛋白悬液芯片检测，蛋白表达纯化，蛋白质谱等。

1. **细胞研究平台**

服务项目：细胞周期，细胞凋亡，细胞增殖，细胞共培养及趋化，细胞迁移及侵袭，细胞粘附检测，流式细胞检测，稳转细胞系构建，细胞单克隆形成检测，双荧光素酶检测，显微拍照检测等。

1. **病毒包装平台**

服务项目：慢病毒包装，逆转录病毒包装，腺病毒包装，腺相关病毒包装等。

1. **病理染色**

服务项目：各类切片及染色服务，免疫荧光，免疫组化，原位杂交染色等。

1. **动物模型平台：**

服务项目：常见疾病动物模型及肿瘤模型构建。

**我们的服务承诺：** █ 唯一 █ 真实 █ 专业 █ 效率

欢迎科研院所、医院、生物医药企业的广大用户来我公司进行科研项目订制，我们将为您提供专业高效的一站式科研服务。

## 声明

为保证独立、客观、公正地从事检验检测工作，提高服务质量。现以奥创生物名义，向社会各界和客户作如下声明，并接受有关单位和客户的监督。

1、遵守国家的各项法律、法规、政策，严格执行有关标准，规范及细则等技术文件开展检测工作，以诚实、公正的态度确保检测工作质量，并对检测结果负责。

2、公司具有固定的工作和检验检测场所，拥有与开展的检测工作相匹配的专业技术、管理人员，拥有相关检测所需的设备设施。

3、承诺对客户的技术、资料、数据和其他商业机密严格保密，切实维护客户的权益，绝不利用客户的技术和资料从事技术开发和技术服务。

4、承诺对所有委托方一视同仁，提供相同的优质、高效服务，保证检测数据和结果的真实、客观、准确。

5、承诺出具的检验检测数据、结果独立于所涉及的利益相关方，不受任何可能干扰其技术判断因素的影响，确保检验检测数据、结果的真实、客观、准确。

以上声明，本公司全体人员必须严格遵守。

成都奥创生物科技有限公司

目录

[声明 4](#_Toc171584054)

[一、 样本信息 6](#_Toc171584055)

[二、 实验仪器 6](#_Toc171584056)

[三、 实验步骤 7](#_Toc171584057)

[1、 细胞悬液制备 7](#_Toc171584058)

[2、 细胞铺板 8](#_Toc171584059)

[3、 分组造模 8](#_Toc171584060)

[3.1 构建重组质粒 8](#_Toc171584061)

[3.2瞬时转染： 9](#_Toc171584062)

[四、 数据分析 11](#_Toc171584063)

# 样本信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 样本来源 | 样本类型 | 样本量 |
|  |  |  |  |

# 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 品牌 | 型号 |
| 高速冷冻离心机 | SciloEGX | CF1524R |
| 高速低温组织研磨仪 | Servicebio | KZ-IH-F |
| 微量离心机 | SciloEGX | S1010 |
| PCR仪 | LABGIC | LTC-PCR-196 |
| 荧光酶标仪 | Tecan | F200 |
| 恒温培养箱 | LABGIC | HI-80V（CX） |
| 超微量分光光度计 | KAIAO | K5600 |
| 超净工作台 | 尚光 | IFD |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640110 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 464000 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640040 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640050 |
| 手动单通道移液器 | 赛默飞 | 4640060 |
| 手动单通道移液器 | Eppendorf | M15465K |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 品牌 | 货号 |
| DMEM细胞培养基 | Biosharp | BL304A |
| DEPC水 | Biosharp | BL510B |
| 胎牛血清（FBS） | 四季青 | 11011-8611 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 耗材名称 | 品牌 | 货号 |
| 胰蛋白酶（Trypsin） | Biosharp | BL526A |
| 双抗（P/S） | Biosharp | BL505A |
| 磷酸盐缓冲液（PBS） | Biosharp | BL316A |
| 血球计数板 | Marienfeld | 650030 |
| 细胞培养瓶 | LABSELECT | 13112A |
| Lipo6000™转染试剂 | Beyotime | C0526 |
| SwiftCut XhoⅠ | 诺唯赞 | C420 |
| SwiftCut NotⅠ | 诺唯赞 | C412 |
| LB液体培养基（干粉） | Biosharp | BL1056A |
| LB固体培养基（干粉） | Biosharp | BL1057A |
| 氨苄青霉钠盐 | Biosharp | BS923-5g |
| T4 DNA连接酶 | 诺唯赞 | C301 |
| 2×Taq plus PCR Master Mix | Biosharp | BL1361B |
| Dual-Luc双萤光素酶报告基因检测试剂盒（预混） | Biosharp | BL1609A |
| 0.22μm细菌过滤器 | Biosharp | BS-PES25-22-S |
| 移液器吸头 | Biosharp | BS-RT-1250 |
| 离心管 | Biosharp | BS-15-M |
| 6孔细胞培养板 | LABSELECT | 11210 |
| 12孔细胞培养板 | LABSELECT | 14211-D |
| 24孔细胞培养板 | LABSELECT | 11310 |
| pisCHECK2质粒 | / | / |
| pCMV-C-EGFP | / | / |
| 琼脂粉 | Biosharp | BS081-100g |

# 实验步骤

### 细胞悬液制备

细胞处理前需将超净工作台紫外消毒30 min，选择处于对数生长期且细胞融合率约80%的细胞，在超净工作台中吸弃培养基，加入1 mL PBS清洗细胞碎片与残留培养基，吸弃PBS，加入1 mL 0.25%的胰酶消化液，37℃消化1 min后加入1 mL细胞完全培养基终止消化，吹打贴壁的细胞并混匀，显微镜下测细胞浓度。

将细胞悬液1000 rpm离心1 min，吸弃上清液，加入2 mL完全培养基重悬并吸打混匀，计算实验所需的细胞量（若细胞浓度为1\*106个/mL，按照每孔加入2\*104个细胞、100μL细胞悬液，加满60个孔计算，则需要6mL细胞悬液，共计1.2\*106个细胞。吸取1.2mL浓度为1\*106个/mL的细胞悬液，加入4.8mL的完全培养基，混匀即可）。

### 细胞铺板

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **孔板** | **工作体积** | **细胞数** |
| 6孔细胞培养板 | 2 mL | 8\*105 |
| 12孔细胞培养板 | 1 mL | 4-5\*105 |
| 24孔细胞培养板 | 500 μl | 2.5\*105 |
| 96孔细胞培养板 | 100 μl | 4-5\*104 |

### 分组造模

### 3.1 构建重组质粒

1) 按照课题设计要求，设计不同组合，如对照组、实验组和阴性对照组，以便进行比较和分析。

2) 制备重组双荧光素酶报告基因表达载体：

1. 将质粒和目的条带进行Not Ⅰ和Xho Ⅰ双酶切过夜，1%琼脂糖凝胶电泳纯化，胶回收酶切完的质粒条带及目的条带；
2. 根据T4 DNA连接酶说明书配置连接体系，室温连接1h；
3. 准备冰盒，将感受态-80℃冰箱取出放置于冰上，待感受态融化，加入5-10μl连接产物，轻弹管底；
4. 将感受态静置于冰上30mins，42℃水浴热激45-90s，随后迅速放置于冰上静置2mins；
5. 向EP管中加入900μl无抗生素的LB液体培养基，37℃，200rpm摇床复苏45-60mins；
6. 复苏完成后，5000g离心1min，吸取900μl上清弃去，重悬沉淀，取50μl涂板，37℃倒置培养过夜，进行克隆筛选；
7. 第二天观察平板是否长菌，准备装有Amp的1.5mL 无菌EP管，挑取单克隆到EP管，菌落PCR体系中以及固体培养基（保存单克隆），做好标记，使用菌落PCR鉴定重组载体是否建构成功，菌落PCR体系如下；
8. 菌落PCR体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积（单孔） |
| 2xTaq聚合酶 | 5μl |
| 鉴定引物 | 1μl（10μM） |
| 无酶水 | To 10μl |

1. 若出现目的条带，则说明重组质粒构建成功，送出测序检测；
2. 使用Snapgene或DNAMAN软件进行比对，目的是检测条带是否与客户提供目的条带一致，是否出现突变、缺失等问题；
3. 测序结果正常，对单克隆菌液扩大培养，提取重组质粒，测定浓度；

3) 转染条件：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **孔板** | **DNA转染** | | **RNA转染** | |
| 试剂 | Lipo 6000 | DNA | Lipo 6000 | RNA |
| 6孔细胞培养板 | 5 μl | 2.5 μg | 5 μl | 100 pmol |
| 12孔细胞培养板 | 2 μl | 1 μg | 2 μl | 40 pmol |
| 24孔细胞培养板 | 1 μl | 500 ng | 1 μl | 20 pmol |
| 96孔细胞培养板 | 0.2 μl | 100 ng | 0.2 μl | 4 pmol |

### 3.2瞬时转染：

1) 按照课题设计要求，设计不同处理组合，如对照组、实验组和阴性对照组，以便进行比较和分析。

2) 制备转染试剂：对于待转染的六孔板中每一个孔的细胞，取两个洁净无菌离心管，分别加入125 μl不含抗生素和血清的DMEM培养液(高糖DMEM或低糖DMEM均可)，然后于其中一管加入2.5 μg质粒DNA，并用枪轻轻吹打混匀（A液）；另一管加入5 μl Lipo6000™转染试剂（B液），用枪轻轻吹打混匀，请特别注意不可Vortex或离心。室温静置5分钟后(通常最长不宜超过25分钟)，将A液轻轻加入B液中，轻轻颠倒离心管或者用枪轻轻吹打混匀，室温静置5分钟(室温存放6小时内稳定)。

##### 4、转染后培养

##### 4.1 瞬时转染后培养：

1) 37℃培养6 h，6 h后更换培养基，加入新鲜培养基到工作体积；

2) 转染后12 h、24 h、36 h、48 h内观察绿色荧光蛋白，拍摄照片，确定转染效率；

3) 转染效率达80%后可检测重组质粒表达情况（qPCR；Western-blot等）

##### 4.2双荧光素酶报告基因实验

1) 裂解细胞：将报告基因细胞裂解液充分混匀后，按如下方式加入报告基因细胞裂解液，充分裂解细胞。

a. 对于贴壁细胞：吸尽细胞培养液后，参考下表加入适量的报告基因细胞裂解液；对于悬浮细胞：离心去上清后，参考下表加入适量报告基因细胞裂解液；

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 孔板 | 96孔板 | 48孔板 | 24孔板 | 12孔板 | 6孔板 |
| 报告基因细胞裂解液(μl /孔) | 100 | 150 | 200 | 300 | 500 |

2) 融解萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测缓冲液，并达到室温。海肾萤光素酶检测底物(100×)置于冰浴或冰盒上备用；

3) 按照每个样品需100μl的量，取适量海肾萤光素酶检测缓冲液，按照1:100加入海肾萤光素酶检测底物(100×)配制成海肾萤光素酶检测工作液；

4) 按仪器操作说明书开启化学发光仪或具有检测化学发光功能的多功能酶标仪，可以将测定间隔设为2秒，测定时间设为10秒，或者根据仪器设备的要求并根据实验需要设置适当的间隔时间和测定时间；

5) .每个样品测定时，取样品20-100微升(如果样品量足够，请加入100微升；如果样品量不足可以适当减少用量，但同批样品的使用量宜保持一致)，取等体积的报告基因细胞裂解液作为空白对照；

6) 加入100微升萤火虫萤光素酶检测试剂，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定RLU (relative light unit)；

7) 在完成上述测定萤火虫萤光素酶步骤后，加入100微升海肾萤光素酶检测工作液，用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定RLU (relative light unit)；

# 数据分析

在以海肾萤光素酶为内参的情况下，用萤火虫萤光素酶测定得到的RLU值除以海肾萤光素酶测定得到的RLU值。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。如果以萤火虫萤光素酶为内参，也可以进行类似计算。

**详细实验结果见附件一、附件二**